



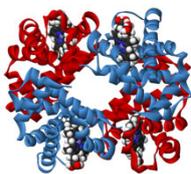
# 腎・泌尿器疾患への 糖鎖生物学的アプローチ

弘前大学大学院医学研究科泌尿器科学講座  
大山 力

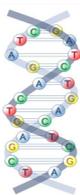
1

## 生命活動に必須の高分子物質：生命鎖 3つの生命鎖

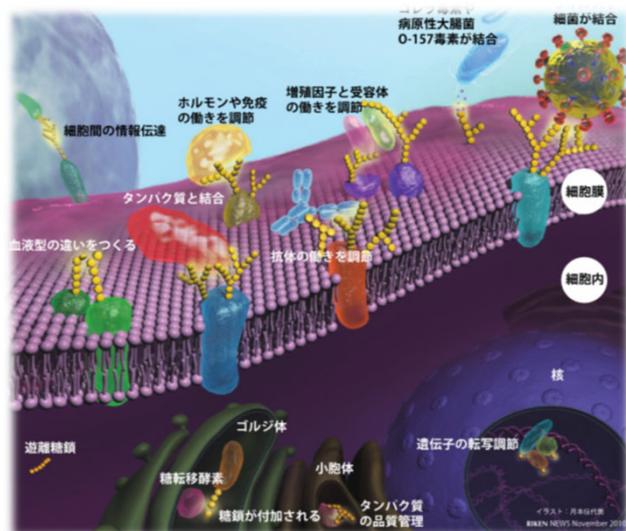
タンパク質



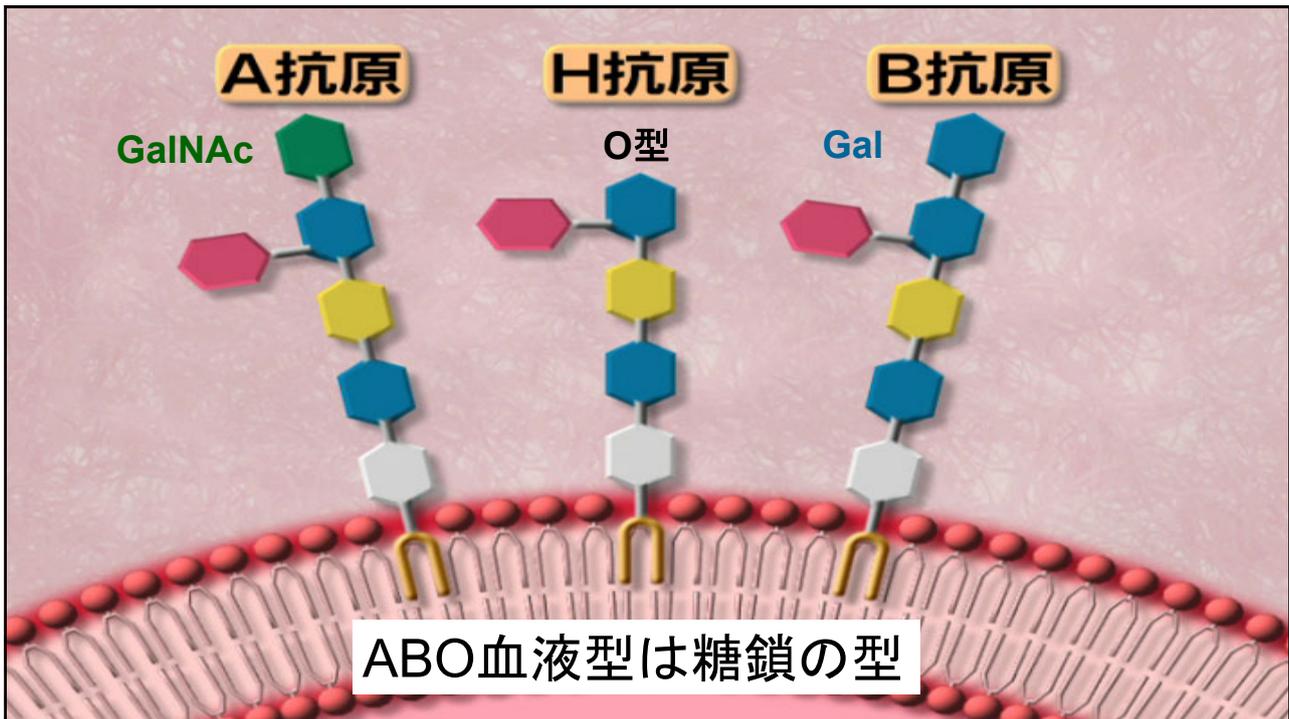
核酸



糖鎖



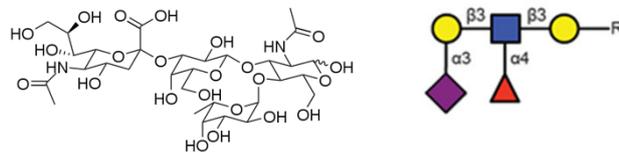
2



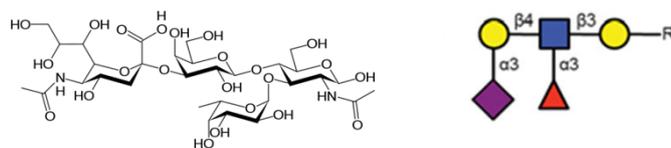
3

## 糖鎖腫瘍マーカー

- CA19-9 = Sialyl Lewis A; liver, pancreas, bill-duct, etc.



- SLX = Sialyl Lewis X; lung, liver, breast, pancreas, colon, etc.

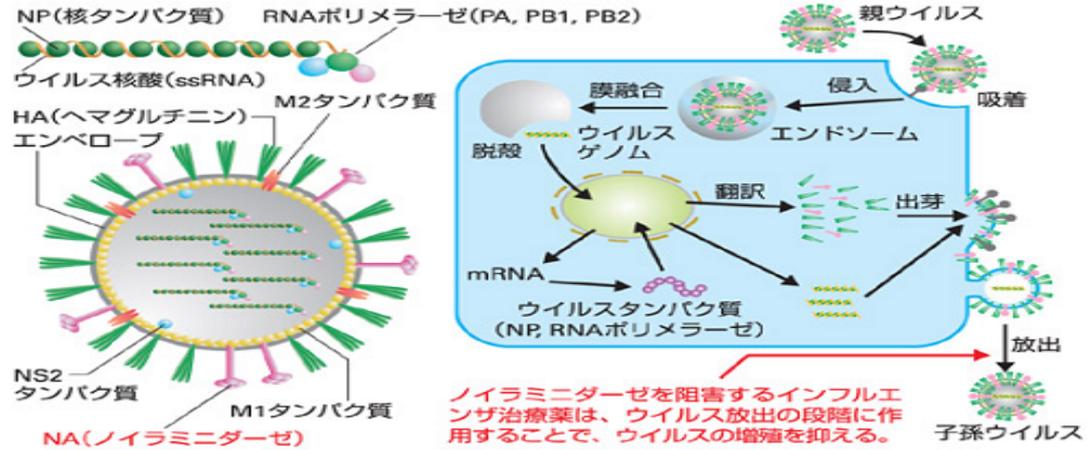


4

## 抗インフルエンザ薬(タミフル等) シアリダーゼ(ノイラミニダーゼ)阻害剤

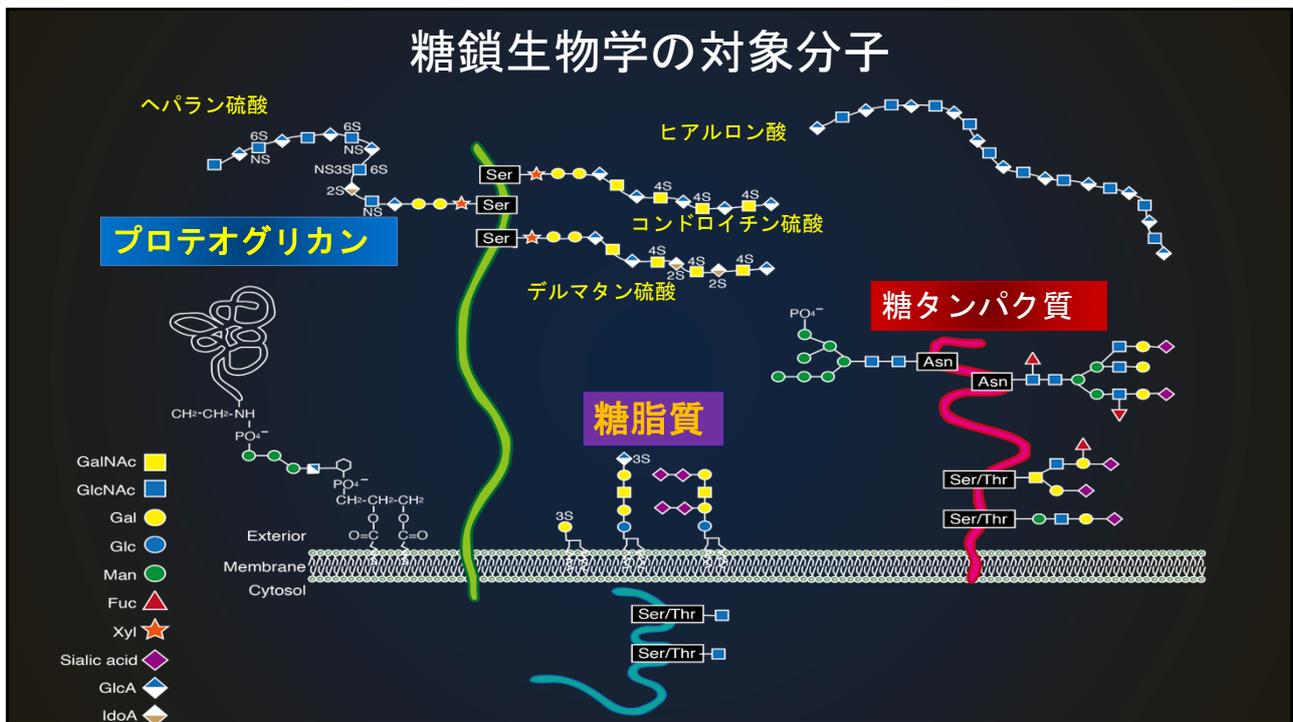
ノイラミニダーゼ阻害薬とは何か？

(出典: 理化学研究所)



5

## 糖鎖生物学の対象分子

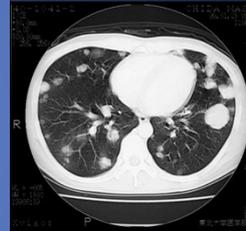


6

弘大医学部卒後3-4年目(1987年頃)  
 外科系臨床医学の限界を感じた  
**がんはなぜ転移するの？なぜ再発するの？**  
**しっかり手術で取ったのに！**



腎細胞がん



肺転移

7

Seattle

福士泰夫先生  
 Fred Hutchinson  
 Cancer Research Center  
 1982-1984  
 FH6,7,9

糖脂質研究の第一人者  
 ワシントン大学終生教授

**精巣腫瘍の糖脂質発現パターン**  
 1987

箱守研で構造解析

→ Gb<sub>3</sub>-sialoside

(Int J Cancer 1990, J Urol 1992, Cancer 1995)

8

## La Jolla Cancer Research Center

*The BURNHAM INSTITUTE*  
From research, the power to cure.

1996-1998

糖タンパク糖鎖研究の第一人者  
福田 穰 先生  
福田 道子 先生

9

## 白血球の炎症部位への遊走

シアリルルイスX  
(白血球)

は

E-セレクチン  
(血管内皮細胞)

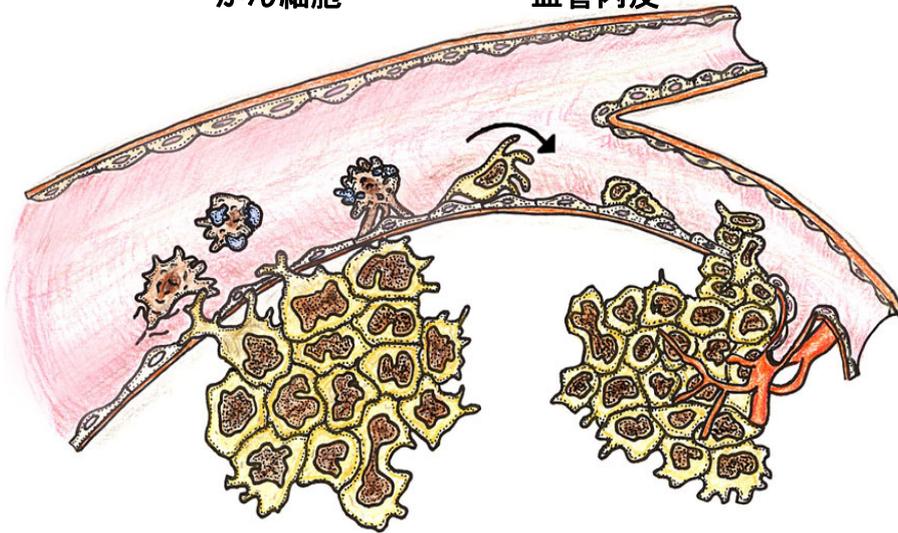
シアリルルイスX  
Sialyl Lewis X

*Lowe JB et al, Cell, 1990*  
*Phillips ML, et al, Science, 1990*  
*Walz G, et al, Science, 1990*

10

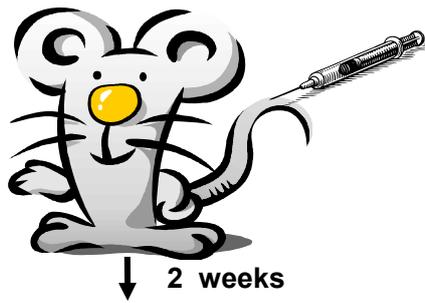
# 血行性転移の分子メカニズム

シアリルルイスX がん細胞 ← E-セレクチン 血管内皮



11

シアリルルイスX発現量を調節したB16-F1 Minoru Fukuda Michiko Fukuda



N

M

H

中等度発現細胞の転移能が高い！



12

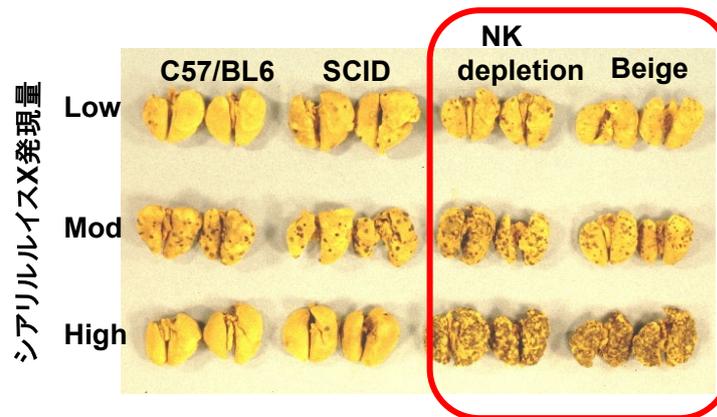
## 免疫不全マウスを用いた転移実験

	T cell	B cell	NK cell	Macrophage
C57BL/6	●	●	●	●
nude		●	●	●
SCID			●	●
beige	●	●		●
NK depletion by anti-asialoGM1	●	●		●

13

## メラノーマの肺転移

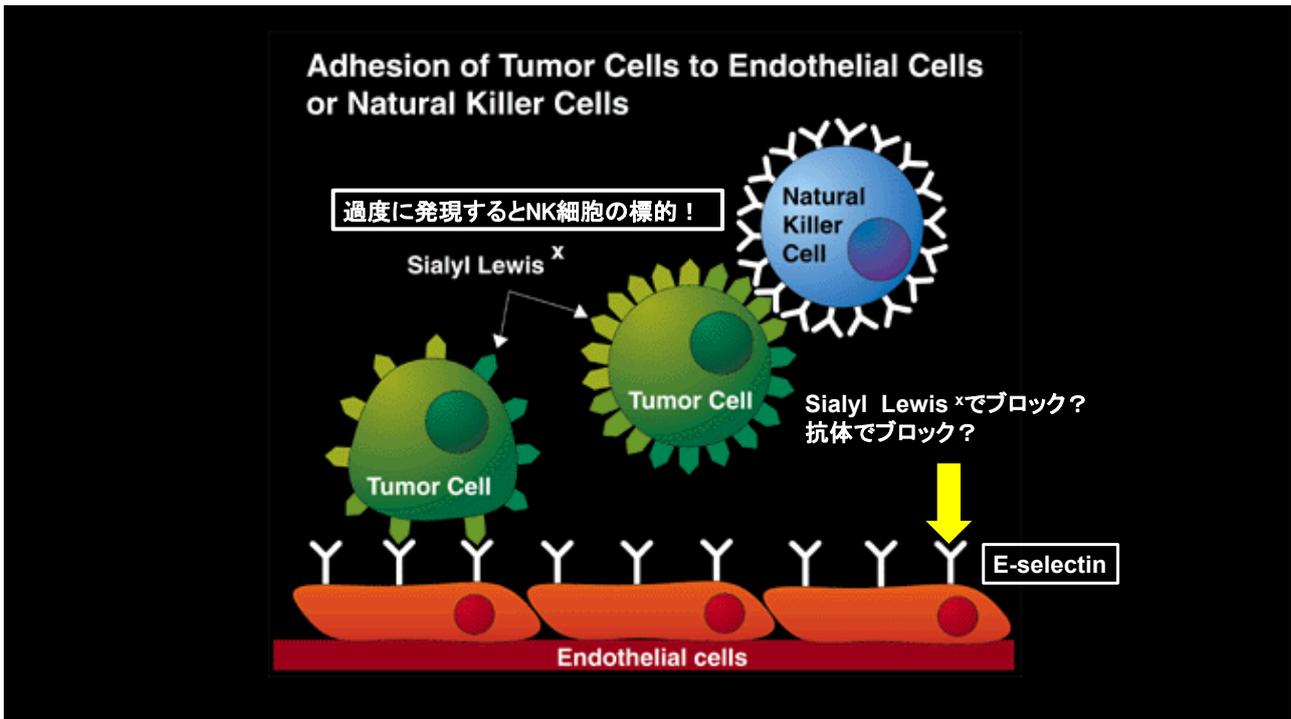
癌細胞のシアリルルイスXと宿主のNK細胞に依存する



NK細胞がないとシアリルルイスX発現量と転移能が相関する

(EMBO J 1999, PNAS 2002)

14



15

sLe<sup>x</sup>の合成はお金がかかるわ!  
糖鎖をペプチドでmimicするの!  
(Cancer Res, 2000)

E/P-selectin ノックアウトマウス  
シアリルルイスX陽性癌細胞は、肺に転移した!  
(Zhang J, Ohyama C, Fukuda MN, Cancer Res 2002)

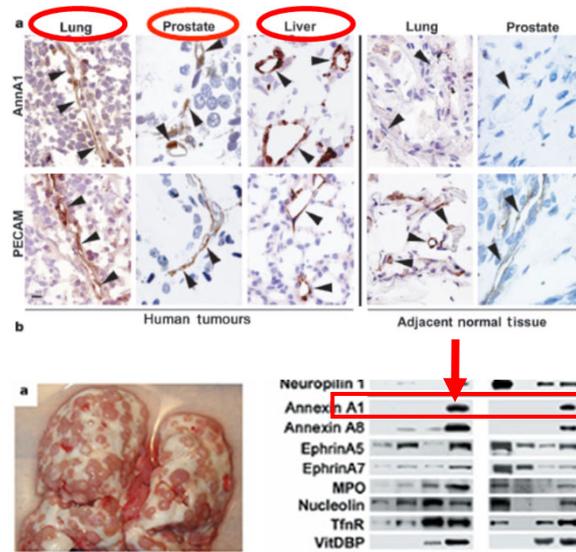
# がんの転移

シアリルルイスX/A (がん細胞) は ANK1 (血管内皮細胞) に結合

弘大泌尿器科から留学  
(Hatakeyama S, Fukuda MN, PNAS 2009)

16

## アネキシンA1:がん血管内皮に発現



Oh P., et al Nature 2004

17

アネキシンA1標的のがん治療！

アネキシンA1に結合するペプチド

IF7ペプチド

IFLLWQR

イソロイシン・フェニールアラニン・ロイシンx2・トリプトファン・グルタミン・アルギニン



福田道子先生



畠山真吾

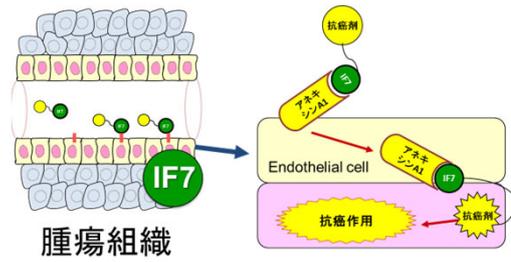
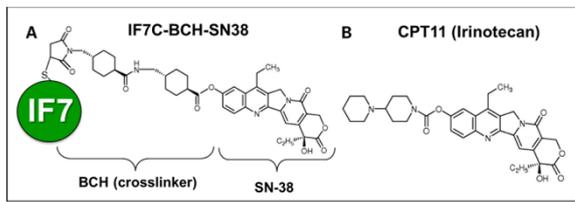
Hatakeyama S et al. PNAS 2011

18

# アネキシンを標的とする 癌化学療法

## IF7-SN-38

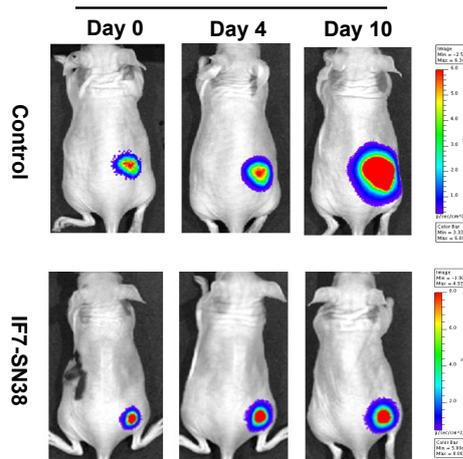
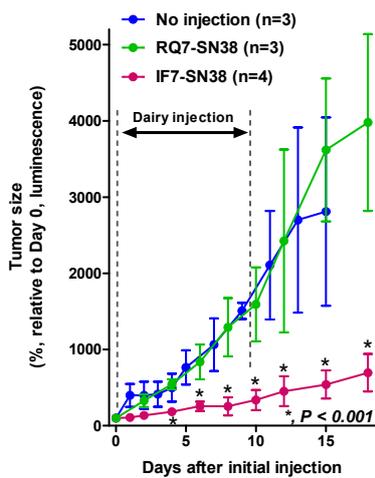
- SN-38: イリノテカン活性代謝物



Hatakeyama S et al. PNAS 2011

19

## IF7-SN38の有効性と安全性



2022年10月

**IF7-SN38 Cancer Trial in Dogs**

To assess the effectiveness of a novel chemotherapeutic in dogs with cancer.

Baseline screening performed at your veterinarian is required for entrance into the study.

**Inclusion Criteria**

- Dog is a minimum of nine months of age.
- Dog has no major concurrent health issue.
- Dog is eligible to begin chemotherapy immediately.
- Dog has been diagnosed with cancer and the largest tumor < 5cm.
- Dogs with metastatic disease and/or resistant to standard of care therapy will be considered.
- Pet owner is willing and able to sign a consent form and comply with all study procedures for the duration of the study.

**Exclusion Criteria**

- Anticipated life expectancy < 8 weeks.
- Single or double positive for MDR1 genetic mutation.
- Evidence of serious systemic disorder.
- Any condition that may preclude the evaluation of safety and/or activity of the study drug.
- Other concurrent cancer treatment, investigational drug or intervention.

Veterinary Clinical Trials Network  
 Email: [vctn@jhmi.edu](mailto:vctn@jhmi.edu)  
 Website: <http://www.hopkinsmedicine.org/vctn>  
 Phone: 410-614-0105  
 Principle Investigator: Dr. Rebecca A. Krinits

使用薬剤量は、SN38 有効量 (95mg/kg) の**2%** (1.8mg/kg)

Hatakeyama S et al. PNAS 2011

20



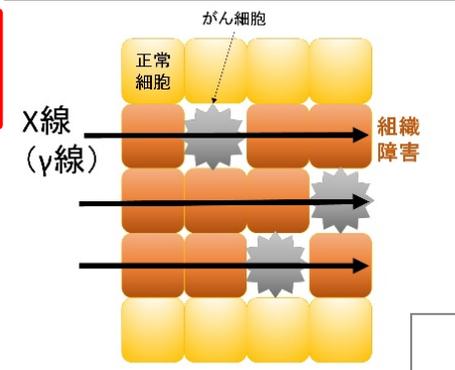
HIROSAKI UNIVERSITY

## ホウ素中性子捕捉療法(B<sup>10</sup>oron Neutron Capture Therapy: BNCT)

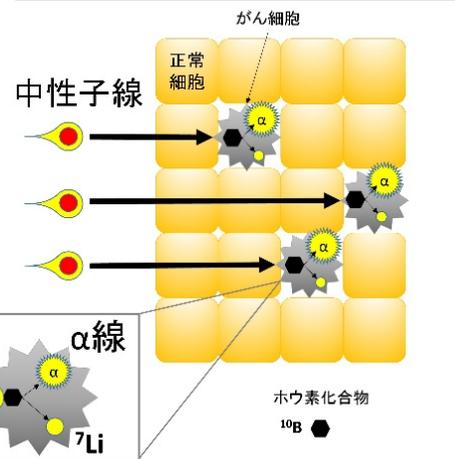
**IF7**  
**想定外の展開**

理工学部  
石山新太郎教授  
2015年  
医工連携  
医学研究科教授会で  
BNCTを紹介

**現行の放射線治療**  
**正常組織へのダメージ(大)**



**BNCT**  
**正常組織へのダメージ(無)**



21

## BNCTの問題点①

- ・ホウ素薬剤<sup>10</sup>BPAは正常臓器にも集積
- ・急速大量点滴・大量投与が必要

**薬剤集積臓器別の有害事象**

※照射部位によって発症確率は全く異なる

臓器	照射	1日	3日	1週	2週	1ヵ月	3ヵ月	6ヵ月
脳								脳圧亢進・浮腫
粘膜								粘膜炎・粘膜出血
耳下腺			耳下腺炎(腫脹・疼痛)					
			アミラーゼ上昇 <small>値&lt;1000</small>					
			嘔気・嘔吐					
味蕾								味覚異常
毛根								脱毛
水晶体								白内障(発症時期)
血液								リンパ球減少 Gr1

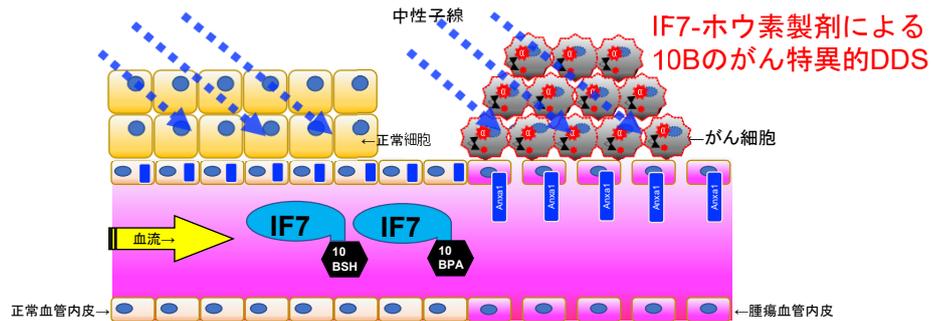


・体重60 kg  
<sup>10</sup>BPA 30 g  
400ml/時間 x2時間点滴静注

22



# IF7 + <sup>10</sup>B drugs



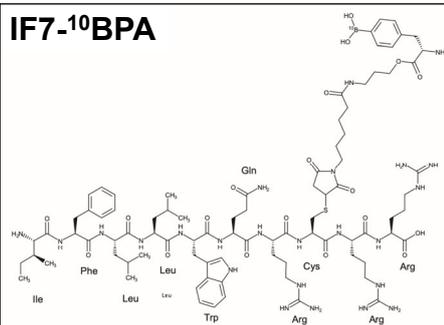
23



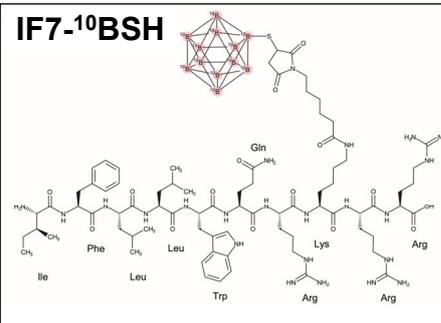
米山 徹

## IF7とホウ素製剤を結合した複合薬剤を開発

### IF7-<sup>10</sup>BPA



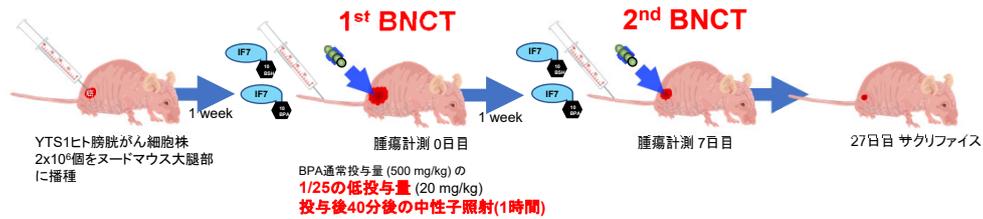
### IF7-<sup>10</sup>BSH



ホウ素中性子捕捉療法用の腫瘍組織を短時間で選択的ないし局所的に標的化できる集積性<sup>10</sup>B薬剤  
出願番号:PCT/JP2019/024367 出願人:弘前大学 弘前大学ベンチャー認定 第8号へ独占実施権

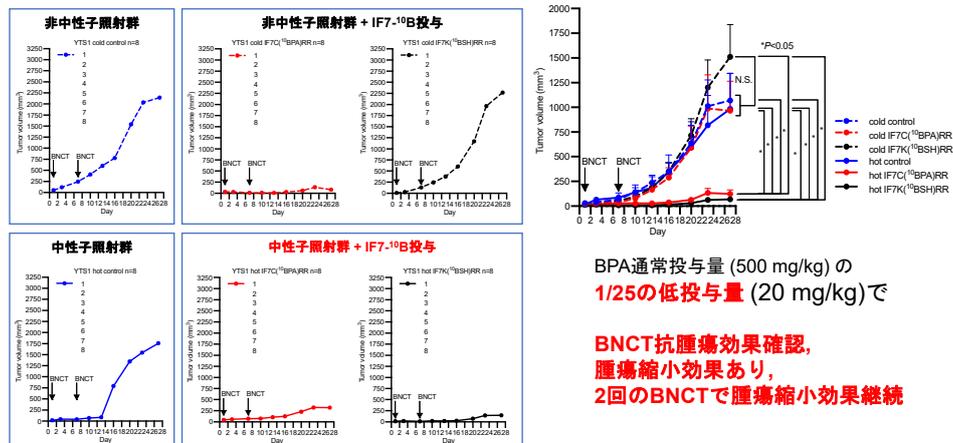
24

## IF7-<sup>10</sup>BPA, IF7-<sup>10</sup>BSH投与後のBNCT



25

## IF7-<sup>10</sup>B-BNCTは低投与量で抗腫瘍効果あり



BPA通常投与量 (500 mg/kg) の  
1/25の低投与量 (20 mg/kg) で

BNCT抗腫瘍効果確認,  
腫瘍縮小効果あり,  
2回のBNCTで腫瘍縮小効果継続

Yoneyama T. et al., *BMC cancer*, 21(1):105, 2021.

26

# BNCTの問題点② 中性子源



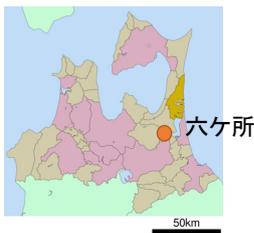
京都大学研究用原子炉  
原子力規制庁の定期検査



京都大学原子炉実験所 鈴木 実 教授

27

# 中性子源が近くにできた 中性子源：小型加速器



平成29年10月オープン  
青森県量子科学センター



<p><b>サイクロトロン加速器</b></p> <p>サイクロトロン加速器は、陽子ビームを加速して、PET用放射性同位体の製造に利用されます。多目的な利用が可能です。また、放射線照射装置として利用することも可能です。</p> <table border="1"> <tr> <th>加速器</th> <th>陽子</th> <th>電子</th> </tr> <tr> <td>ビームエネルギー</td> <td>100MeV</td> <td>100MeV</td> </tr> <tr> <td>最大ビーム電流</td> <td>100μA</td> <td>50μA</td> </tr> </table>	加速器	陽子	電子	ビームエネルギー	100MeV	100MeV	最大ビーム電流	100μA	50μA	<p><b>BNCT装置</b></p> <p>放射線治療装置として利用されます。がん治療に有効です。</p>	<p><b>NRT装置</b></p> <p>がん治療に有効です。</p>	<p><b>PIXE分析装置</b></p> <p>物質分析に有効です。</p>
加速器	陽子	電子										
ビームエネルギー	100MeV	100MeV										
最大ビーム電流	100μA	50μA										
<p><b>薬剤合成装置</b></p> <p>放射性同位体を用いた薬剤合成に有効です。</p>	<p><b>PET/CT装置</b></p> <p>がん診断に有効です。</p>	<p><b>PET/MRI装置</b></p> <p>がん診断に有効です。</p>										

28

**量子ビームのがん治療「BNCT」 新薬剤開発、特許出願**

弘前大学大学院工学研究科の大山教授らが、がん治療に特許出願した量子ビームを用いた新薬剤「DDS-10B」を開発した。この薬剤は、がん細胞に選択的に作用し、正常細胞を傷めず、がん細胞を壊滅させる効果がある。大山教授は、この薬剤の開発に10年以上の時間を費やしている。現在は、動物実験や細胞実験を進め、臨床応用のための準備を進めている。

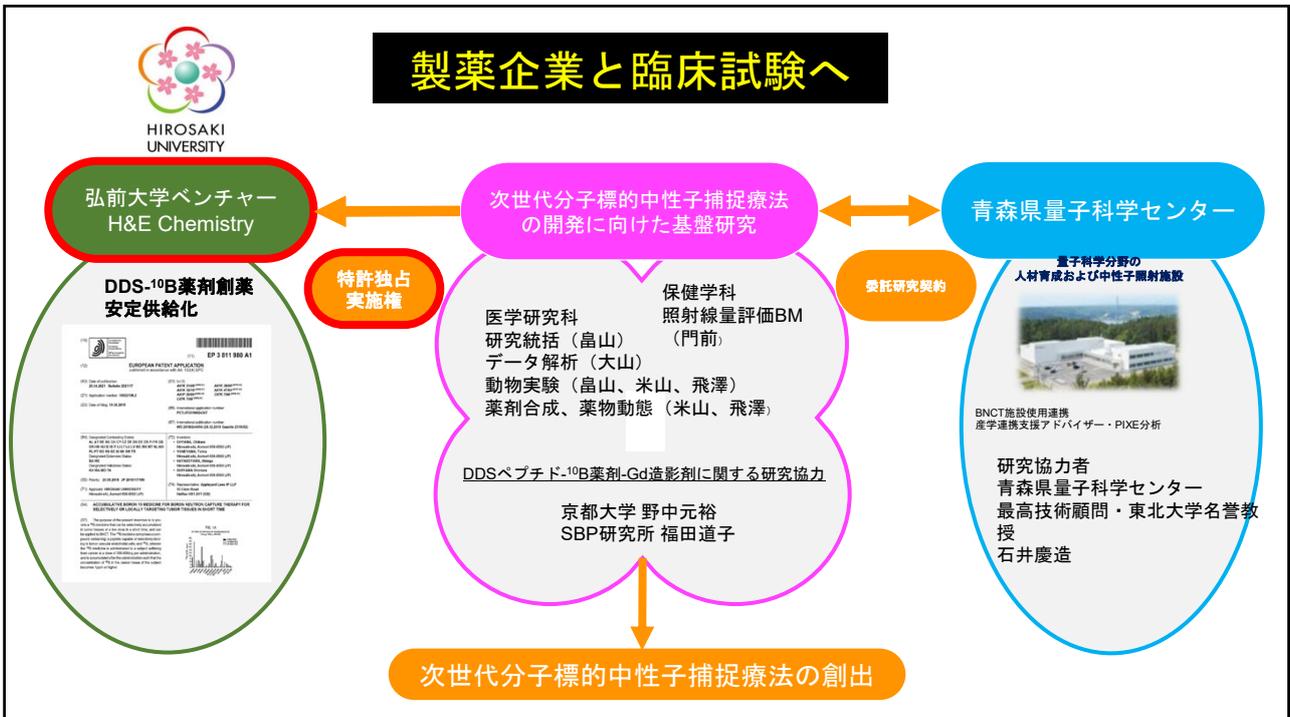
**がん新治療法 県内実験**

弘前大学大学院工学研究科の大山教授らが、がん治療に特許出願した量子ビームを用いた新薬剤「DDS-10B」を開発した。この薬剤は、がん細胞に選択的に作用し、正常細胞を傷めず、がん細胞を壊滅させる効果がある。大山教授は、この薬剤の開発に10年以上の時間を費やしている。現在は、動物実験や細胞実験を進め、臨床応用のための準備を進めている。

**大弘前教授ら 効率的に細胞破壊**

弘前大学大学院工学研究科の大山教授らが、がん治療に特許出願した量子ビームを用いた新薬剤「DDS-10B」を開発した。この薬剤は、がん細胞に選択的に作用し、正常細胞を傷めず、がん細胞を壊滅させる効果がある。大山教授は、この薬剤の開発に10年以上の時間を費やしている。現在は、動物実験や細胞実験を進め、臨床応用のための準備を進めている。

29



30

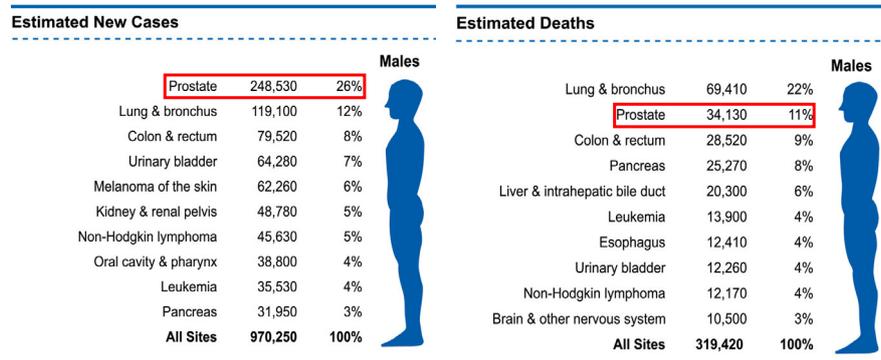
# 小括①

基礎研究もおもしろい。

想定外の展開が待っている。

31

## 米国の癌罹患数と死亡数（2021年）



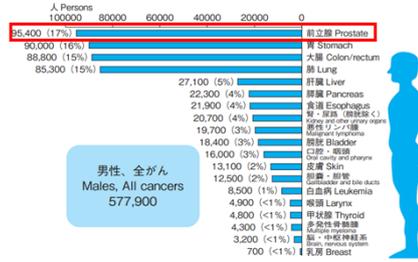
毎年24万人が前立腺癌と診断され  
3.4万人が死亡する

CA: A Cancer Journal for Clinicians, Volume: 71, Issue: 1, Pages: 7-33, First published: 12 January 2021, DOI: (10.3322/caac.21654)

32

# 日本の癌罹患数と死亡数（2021年）

部位別予測がん罹患数（2021年）



部位別予測がん死亡数（2021年）



毎年10万人が前立腺癌と診断され  
1.3万人が死亡する

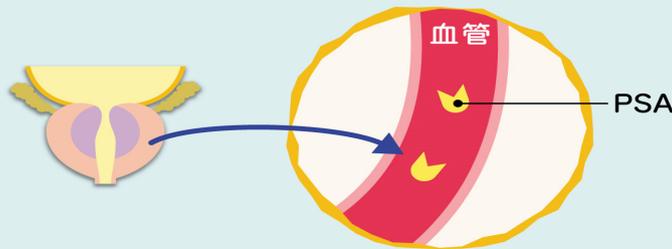
がんの統計  
公益財団法人 がん研究振興財団  
Funded by the Association of Cancer Research

33

## 前立腺癌の腫瘍マーカー：PSA

PSA: Prostate Specific Antigen

PSA (前立腺特異抗原)



前立腺から分泌されるたんぱく質の一種

34

## PSA値判定の目安

**4** ng/mL未満 → **正常**

**針生検対象**

**4~10** ng/mL → **グレーゾーン**

**10** ng/mL以上 → **癌が強く疑われる**

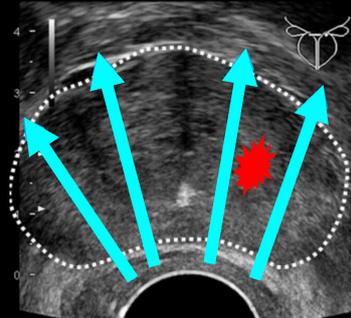
高くなるほど癌の可能性が高い

癌以外に前立腺肥大症など他の前立腺良性疾患でも高くなる

35

## 前立腺生検

経直腸的超音波画像ガイド下に実施された  
系統的前立腺生検



(前立)

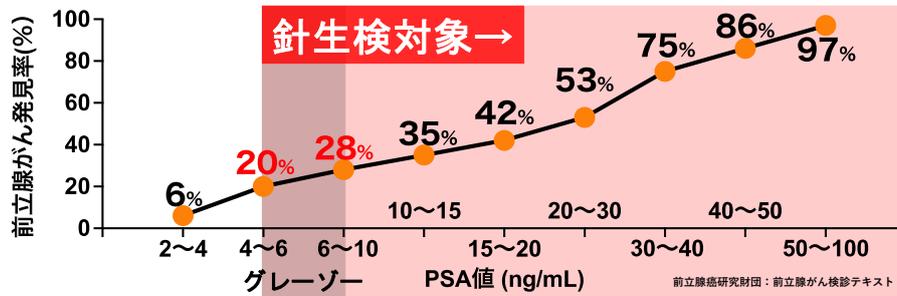
生検(青矢印)をしても、  
癌を見逃してしまっている場合がある。

必要

ds-of-diagnosis/

36

## グレーゾーンにおける針生検のがん陽性率 20-28%



グレーゾーンでは70-80%が「がんではない」

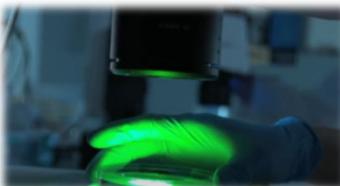
可能なら、針を刺したくない！

37

## 1997年米国留学中に着想

# PSAの癌性糖鎖変異

Sanford Burnham Prebys 研究所

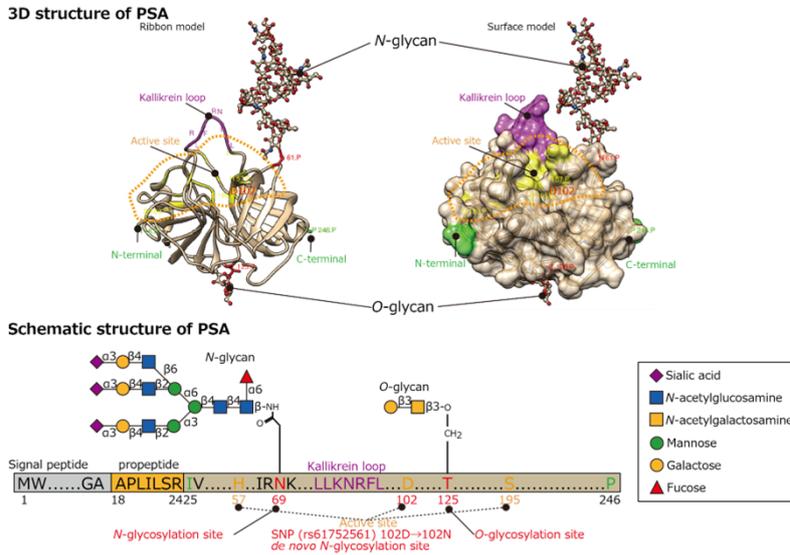


38

# PSA 糖鎖の癌性変異 (着想1997年)



PSAは糖タンパク  
N-glycan 1本だけ！  
もしかして、楽勝プロジェクト？



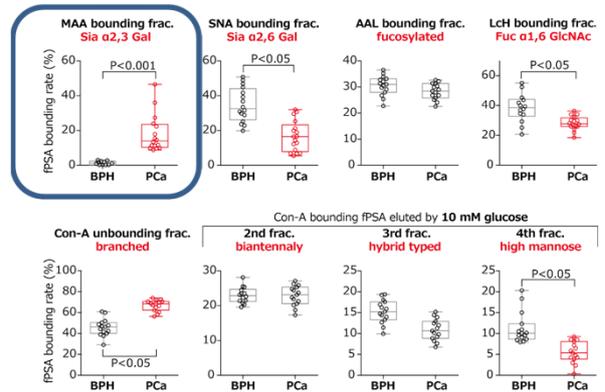
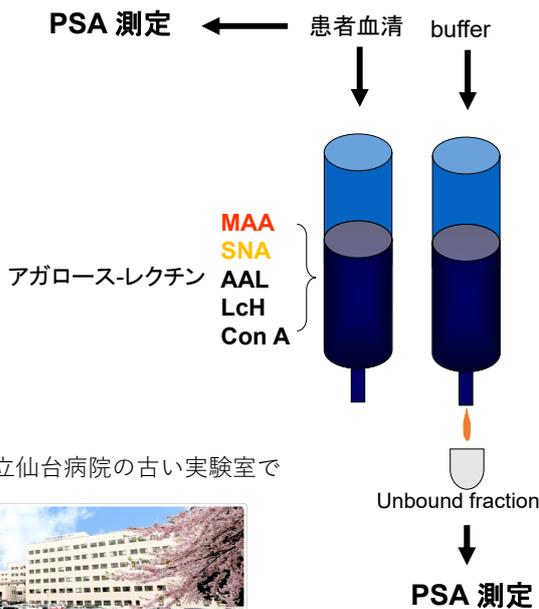
**苦節25年の始まりでした！**

39

# 帰国後：自作のレクチンカラムクロマトグラフィー(1999年)



Ohyama C et al. *Glycobiology*, 14, 671-679 (2004)



旧・国立仙台病院の古い実験室で



**糖鎖構造解析はどうするの？**



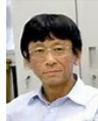
40

# 糖鎖研究者との遭遇



大坂大学  
谷口直之先生

研究代表者: 木下タロウ 先生  
大阪大学  
免疫学フロンティア研究センター  
糖鎖免疫学  
微生物病研究所 生体防御研究部門

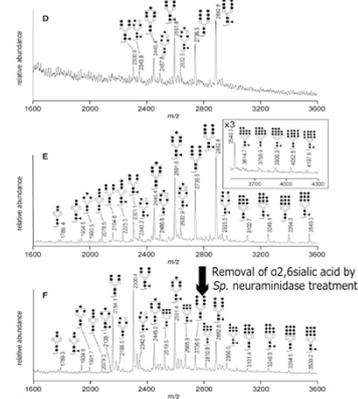


大阪府立  
母子保健総合医療センター  
研究所  
和田芳直先生



## N-glycan structure PSA glycopeptide by MALDI-TOF-MS

Serum PSA from PCa patient:  
\*branched glycan  
\*terminal sialic acid is  $\alpha 2,3$  linkage



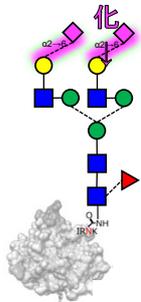
Tajiri M, Ohyama C, Wada Y. *Glycobiology*, 18, 2-8 (2008)

41

正常・良性  $\leftrightarrow$  癌  
PSA糖鎖構造が異なる

**S2,6PSA**

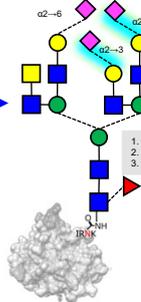
$\alpha 2,6$ シリアル



癌性糖鎖変異

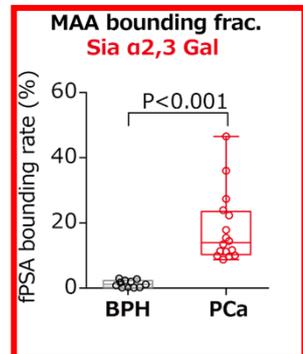
**S2,3PSA**

$\downarrow \alpha 2,3$ シリアル化<sup>\*1-3</sup>



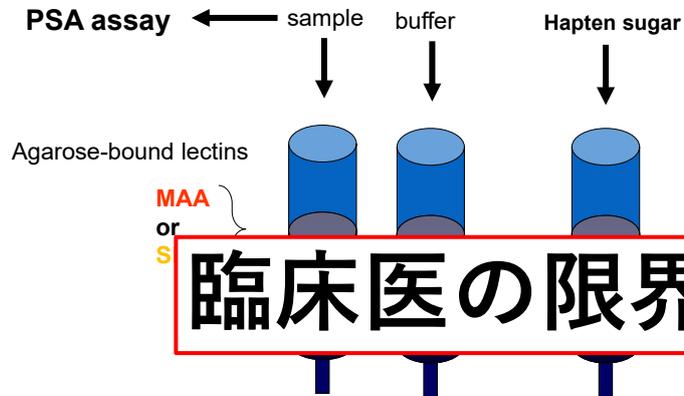
正常 & 良性

前立腺癌



42

## レクチンカラムクロマトグラフィーによる糖鎖癌性変異PSAの測定



**血清0.5ml 必要：大きすぎるアッセイ系**  
**PSA のレンジは20-160ng/ml：4-10ng/mLで判断したい**

43



## 2009年ころから福田ラボの研究者が弘前へ



坪井 滋

米山 徹

飛澤悠葵



Ph.D.

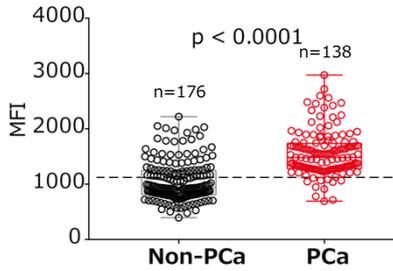
44



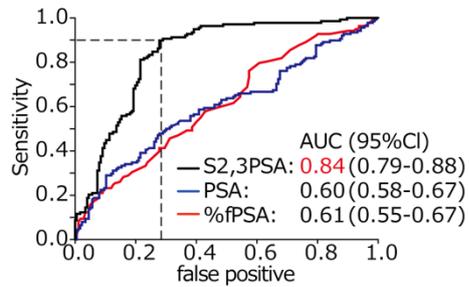
## S2,3PSA testの診断精度はPSAを超えた！



S2,3PSA MFI of Validation Set



Comparing ROC curves of S2,3PSA test & conventional PSA tests

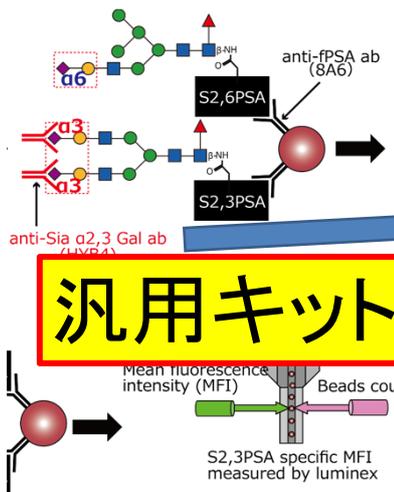


Test Method	Cutoff value	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)	PPV (%)	NPV (%)
S2,3PSA test	>1130 MFI	90.6	64.2	75.8	66.5	89.7
PSA	>4.5 ng/mL	90.6	20.5	51.3	47.2	73.5
%fPSA	<5.26	90.6	11.4	46.2	44.5	60.6

Yoneyama et al. BBRC 448 390-396 (2014)

47

## Luminex法の弱点



Mean fluorescence intensity表示  
絶対値でない！

室温では抗体が反応しない！

汎用キット化には不向き

少数の移植施設に  
設置！

48



HIROSAKI UNIVERSITY



臨床検査薬研究所



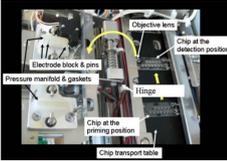
Value from Innovation



石川 友一

弘大大学院入学

## 自動化・キット化への共同研究



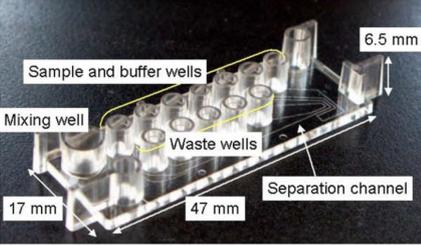
Objective lens  
Chip at the detection position  
Electrode block & pins  
Pressure manifold & gaskets  
Hinge  
Chip at the priming position  
Chip transport table



uTASwako i30  
FULLY AUTOMATED IMMUNOANALYZER



525 mm  
500 mm  
585 mm



Sample and buffer wells  
Mixing well  
Waste wells  
Separation channel  
6.5 mm  
17 mm  
47 mm

キャピラリーゲル電気泳動でのAFP-L1とAFP-L3の分離

DNA標識抗体、蛍光標識抗体、およびAFP抗原を液相中で反応(LBA法)  
L1糖鎖とL3糖鎖のLCA(シス・マルクトン)との親和性の差を利用して分離

LCAゲル

← 移動度大

DNA標識抗体

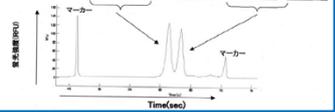
AFP-L1

蛍光標識抗体

LCA

← 移動度小

AFP-L3



電圧強度(V) vs Time(sec)

**MAアレクチンを組み込んだマイクロキャピラリー免疫電気泳動法**

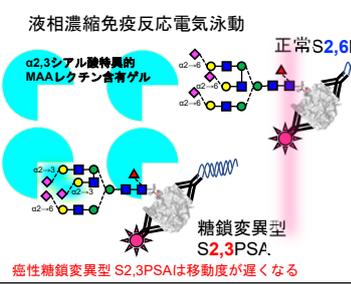
49

## S2,3PSA%検査

「ミュータスワコー S2, 3PSA・i50」

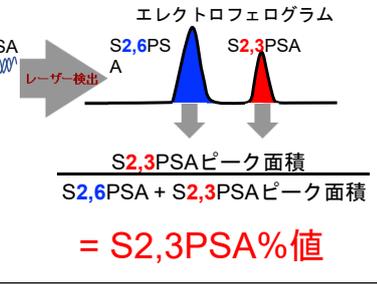
糖鎖変異型S2,3PSAの割合を算出する検査

液相濃縮免疫反応電気泳動



α2,3シアル酸特異的 MAAアレクチン含有ゲル  
正常S2,6PSA  
糖鎖変異型 S2,3PSA  
癌性糖鎖変異型 S2,3PSAは移動度が遅くなる

エレクトロフェログラム

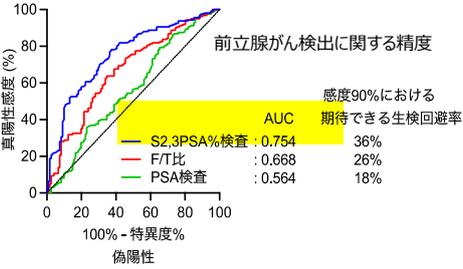


レーザー検出

S2,6PSA A      S2,3PSA

S2,3PSAピーク面積  
-----  
S2,6PSA + S2,3PSAピーク面積  
= S2,3PSA%値

**PSA グレーゾーン 4-10 ng/mL 281例**



前立腺がん検出に関する精度

	AUC	感度90%における期待できる生検回避率
S2,3PSA%検査	: 0.754	36%
F/T比	: 0.668	26%
PSA検査	: 0.564	18%

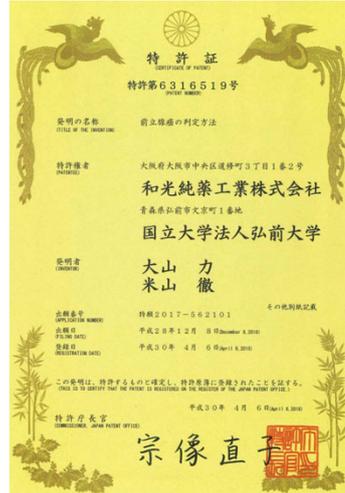
Y-axis: 真陽性感度(%)  
X-axis: 100%-特異度% 偽陽性

検査時間 9分    34 テスト/時間    最小検出感度: 50 pg / mL

50

# 採血だけで診断できないか？

## PSAの糖鎖変化に着目



51



**FUJIFILM**  
Value from Innovation

前立腺癌の診断補助

## S2,3PSA%

前立腺癌で糖鎖変異により増加するS2,3PSA%が、2022年8月22日より検査項目として下記の内容で薬事承認されました。

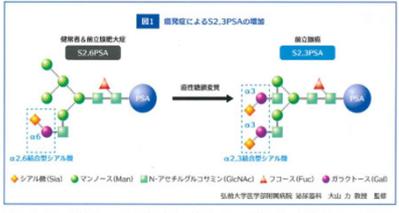
**承認概要**

製品名	ニュータスワコー S2,3PSA-ISO
使用目的	血清中のレクチン反応性による分画したS2,3PSA%の測定（前立腺癌の診断補助）
承認番号	30400EZ00061000
承認日	2022年8月22日



**薬事承認**

前立腺癌の腫瘍マーカーとして使用されるPSAは、前立腺癌や前立腺炎等の癌種においても高値となる場合があります。PSA密度やフリー PSA/トータルPSA比等を指標に鑑別する試みが行われてきましたが、これらの指標を用いても鑑別は容易ではありません。また、PSA検出でグレーゾーンとなった場合には非生検が行われますが、感染症や炎症症などのリスクが増加すること、癌でないが非生検を受けたい患者数が増加しています。



次の目標

**保険収載**

52

## 小括②

- 研究も、一人ではできない。
- チーム・パートナー・サポーターが必要。
- 知的財産権を確保しましょう。

53

Nature 499, 346-349 (18 July 2013) | doi:10.1038/nature12234

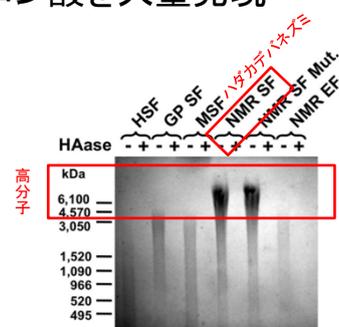
High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat

Xiao Tian, Jorge Azpurua, Christopher Hine, Amita Vaidya, Max Myakishev-Rempel, Julia Ablaeva, Zhiyong Mao, Eviatar Nevo, Vera Gorbunova & Andrei Seluanov



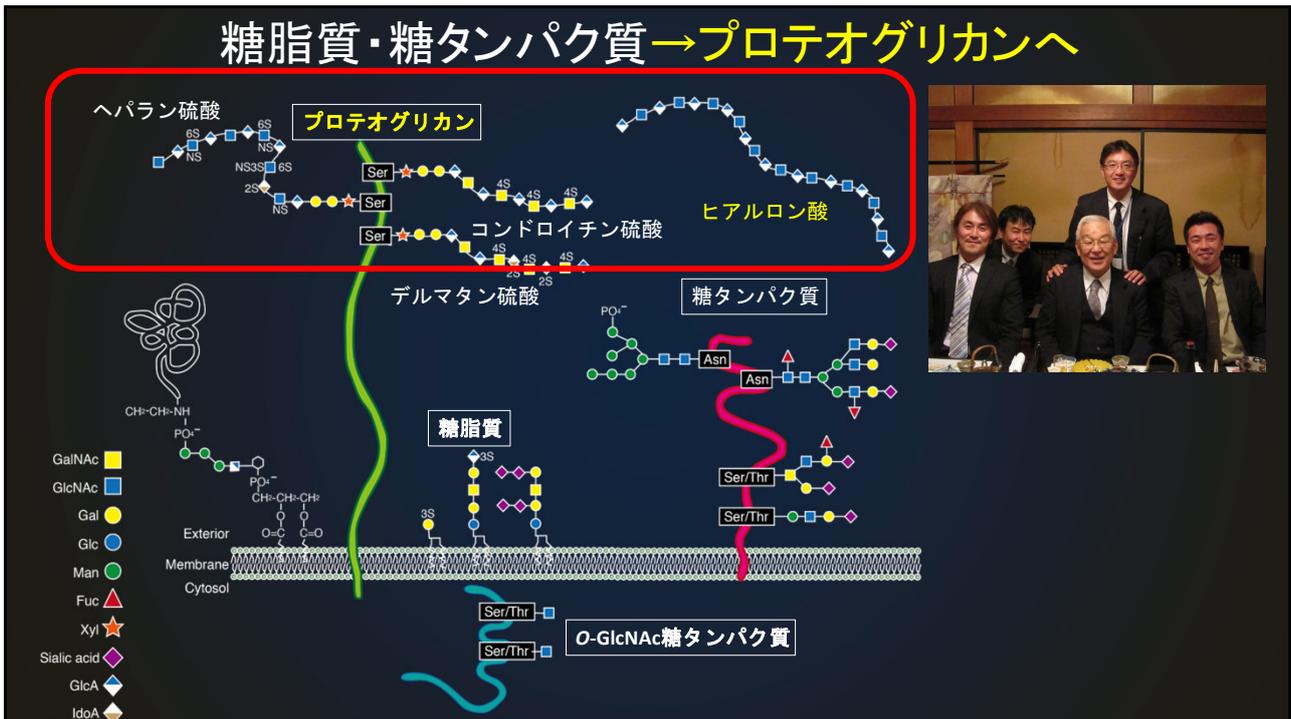
### High molecular weight hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole-rat

- ・ハダカデバネズミは高分子ヒアルロン酸を大量発現
- ・癌になりにくい



ハダカデバネズミは寿命が著しく長い(平均28年: マウスは1-2年)

54



55



**Sanford Burnham Prebys**  
MEDICAL DISCOVERY INSTITUTE



**Yu Yamaguchi's Lab**





山本 勇人



飛澤 悠葵



濱野 逸人



藤田 尚紀





成田 拓磨  
現在留学中



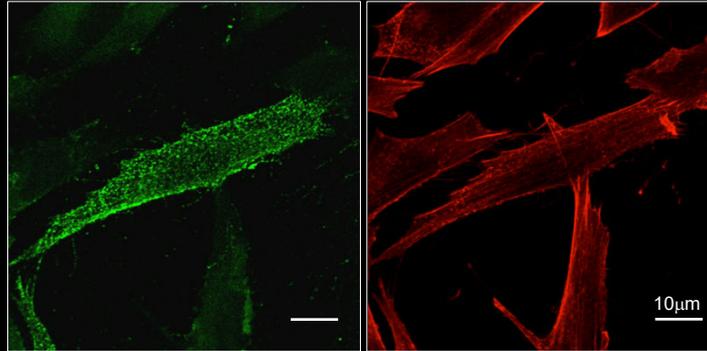
**Long-sought-after Cell Surface Hyaluronidase**  
細胞表面で働いているヒアルロニダーゼは？

56

## TMEM2 は膜貫通型タンパク質：細胞表面に発現

TMEM2 (live stain)

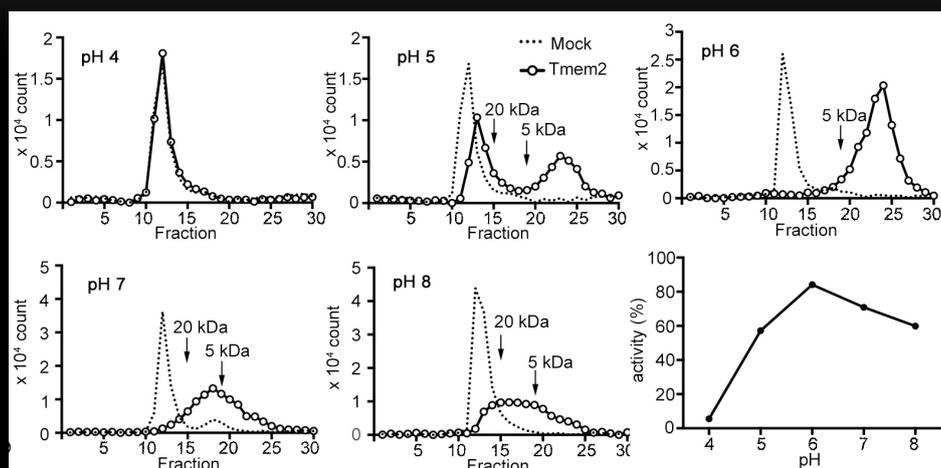
Actin



MG63 cell

57

## TMEM2はpH5-8でヒアルロン酸を分解する



- TMEM2 is active in the range of pH 5-8 with the highest activity around pH 6.  
 ➤ TMEM2 is unlikely to be enzymatically active in lysosomes.

58

# JBC Editor's pick

## "A Mammalian Homolog of the Zebrafish Transmembrane Protein 2 (TMEM2) Is the Long-sought-after Cell Surface Hyaluronidase"

(Feb. 28 2017)



山本 勇人

# 第1回箱守仙一郎賞



遺伝子改変動物によるTMEM2の機能解析

